

Fusionspolypeptide und deren Verwendung für die antivaskuläre Tumorthherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionspolypeptide, die aus mindestens zwei Peptiden zusammengesetzt sind. Ein Peptid besteht aus 3 bis 30 Aminosäuren und ermöglicht eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Endothelzellen in Tumorgefäßen. Das andere Peptid besteht aus dem Gewebefaktor TF (Tissue Factor) oder einem Fragment davon, wobei der Gewebefaktor und das Fragment dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Endothelzellen in Tumorgefäßen aktivieren können. Die Peptide können entweder unmittelbar oder über einen Linker mit bis zu 15 Aminosäuren miteinander verbunden sein. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung dieser Fusionsproteine bei der antivaskulären Therapie von Tumorerkrankungen sowie deren Verwendung bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

Hintergrund der Erfindung

Eine adäquate Neovaskularisierung ist eine Voraussetzung für ein progressives Tumorstadium (1). Die Neoangiogenese ist insbesondere für die Aufrechterhaltung eines expansiven Tumorstadiums erforderlich, da nur so eine ausreichende Oxygenierung, die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und der Abtransport von Tumorabbauprodukten gewährleistet wird.

Zur Bekämpfung von Tumoren sind daher im Stand der Technik neben den anti-angiogenen Therapiestrategien, welche in den komplexen Prozeß des Wachstums und der Differenzierung der Blutgefäße eingreifen, auch antivaskuläre Therapiestrategien entwickelt worden, die auf eine Zerstörung der Tumorgefäße und einen damit verbundenen Tumor-Infarkt zielen.

Voraussetzung für diese Strategien ist die Identifizierung von Zielstrukturen im Gefäßendothel des Tumors, welche auf ruhenden Endothelzellen im normalen Gewebe nicht vorkommen. Solche spezifischen Zielstrukturen könnten benutzt werden, um Zytostatika oder bestimmte Toxine an die Gefäßendothelzellen des Tumors und weniger an die Tumorzellen selbst heranzubringen. Zielstrukturen, die für diesen Zweck verwendet werden könnten sind bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) und VEGF Rezeptor 2 (VEGFR-2), Endoglin, Endosialin, eine Fibronektin-Isoform (ED-B Domäne), die Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_1\beta_2$, die Aminopeptidase N, das NG2 Proteoglykan und die Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP 2 und 9) (2-13). Arap et al. (8) koppelten beispielsweise Peptide, die $\alpha_1\beta_1$ -

Integrine spezifisch binden, an einen Wirkstoff, der im Stand der Technik für die Chemotherapie verwendet worden war (Doxorubicin). Im Tiermodell zeigte sich, daß die antineoplastische Wirkung des Doxorubicins durch Kopplung an die Peptide verbessert werden konnte.

- 5 Ein alternativer antivaskulärer Therapieansatz besteht in der selektiven Aktivierung der Blutgerinnung in Tumorgefäßen, um eine Tumornekrose zu induzieren. Beispielsweise wurde ein bispezifisches F(ab')₂-Antikörper Fragment erzeugt, das gegen löslichen Gewebefaktor (truncated tissue factor, tTF) und ein MHC-Klasse II Antigen gerichtet ist. Nach experimenteller Induktion des Antigens in Tumorendothelzellen, konnte eine antivaskuläre Therapie durch Verabreichung
- 10 des Antikörpers in einem murinen Neuroblastom Modell gezeigt werden (14). In einer zweiten Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde ein Immunkonjugat eingesetzt, welches tTF gezielt an einen natürlich vorkommenden Marker des Tumorgefäß-Endothels, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), koppelt (15).
- 15 In einem sehr ähnlichen Ansatz wurde ein Antikörperfragment (scFv), welches spezifisch für die onkofetale ED-B Domäne ist, mit tTF fusioniert. Die generierten Fusionsproteine, scFv-tTF, führten zu einem vollständigen und selektiven Infarkt in verschiedenen Tumoren im Mausmodell (16).
- 20 Alternativ dazu wurde tTF an einen Inhibitor des Prostata-spezifischen Membran Antigens gekoppelt (17). Dieses Fusionsprotein induzierte eine selektive Infarktnekrose in einem Ratten Prostata Modell nach intravenöser Gabe. Die Gabe dieses Fusionsproteins führte in Kombination mit einer niedrig-dosierten zytotoxischen Substanz (Doxorubicin) zu einer massiven Tumoregression bis hin zur kompletten Tumor-Eradikation (17). Andere tTF-Fusionsproteine, bestehend aus Antikörperfragmenten gegen VEGFR, Endoglin und VCAM-1, wurden kürzlich be-
- 25 schrieben (18).
- Die im Stand der Technik für die antivaskuläre Tumorthherapie hergestellten Moleküle weisen jedoch Nachteile auf. Es ist insbesondere davon auszugehen, daß diese Moleküle aufgrund ihrer
- 30 Größe immunogen sind. Die Behandlung von Säugetieren mit diesen Molekülen wird daher eine Immunreaktion gegen die Moleküle auslösen, wodurch eine wiederholte Verabreichung der Moleküle unmöglich wird.

- Die Größe des Kopplungspartners, mittels dessen der Peptidanteil, der die Blutgerinnung aktivieren kann, auf das Tumorgewebe gerichtet werden soll, kann ferner die für die Blutgerinnung wesentliche Bildung des makromolekularen Enzym- und Substratkomplexes Faktor VIIa/FX sterisch hindern. Die Bildung des Komplexes kann auch dadurch behindert werden, daß das Peptid, wel-
- 5

ches die Blutgerinnung aktivieren kann, durch die relativ großen Fusionspartner eine geänderte Konformation aufweist.

Im Stand der Technik (WO 03/035688) sind weiterhin Fusionspolypeptide bekannt, in denen eine
5 selektive Bindungsdomäne, z.B. eine an Integrine bindende Domäne aus Fibronektin, die z.B. RGD-Peptide umfasst, oder das Dipeptid D- β -E, das an PSMA (Prostata-spezifisches Membran-Antigen) bindet, an den N-Terminus eines Tissue-Faktor-Polypeptids gekoppelt ist. Obwohl *in vitro* eine amidolytische und proteolytische Wirkung gezeigt werden konnte, zeigten die Konstrukte *in vivo*, selbst in Kombination mit Faktor VIIa nur äußerst schwache Anti-Tumorstoffwirkung. Erst in Kom-
10 bination mit Doxycyclin überlebten die Tiere länger.

Hu et al. (46) beschreiben verschiedene Fusionsproteine und deren Verwendung zur Erzeugung von Thrombosen in Tumorgefäßen, u.a. ein Fusionsprotein aus einem Oligopeptid mit 9 Aminosäuren, das die Sequenz RGD enthält, das an die verkürzte Form des Tissue-Faktors gekoppelt
15 wurde. Auch hier wurden die RGD-Peptide mit dem N-Terminus von tTF zu RGD-tTF verknüpft. Funktionsanalysen ergaben, dass das RGD enthaltende Fusionsprotein keine signifikante Hemmung des Tumorstoffwachstums verursachte.

Die im Stand der Technik bekannten Konstrukte wurden daher so aufgebaut, dass die selektive
20 Bindungsdomäne mit dem N-Terminus des Tissue-Faktor-Polypeptids verknüpft wurde. Es wurde sogar betont, dass dieser Aufbau gewählt werden muß, da der N-Terminus aufgrund von Strukturmodellen ein besonders günstiger Ort für eine Verknüpfung sei, welche die Initiation der Thrombose nicht hemme.

25 Zusammenfassung der Erfindung

Gegenüber dem Stand der Technik stellt sich daher die Aufgabe, alternative thrombogene Wirkstoffe zur Verfügung zu stellen, die das Tumorstoffwachstum *in vivo* effektiv hemmen können.

Dieses Problem wurde nunmehr durch Fusionspolypeptide gelöst, welche ein Peptid von 3 – 30
30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptids an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, und den Gewebefaktor TF (Tissue Factor) oder ein Fragment davon umfassen, wobei der Gewebefaktor und das Fragment dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptids an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren
35 können, wobei diese Peptide entweder unmittelbar oder über einen Linker mit bis zu 15 Aminosäuren aneinander gekoppelt sind. Dabei ist das Peptid, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptids an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, an den C-Terminus des Peptids,

das die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, gekoppelt. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, welche entsprechende Fusionspolypeptide enthalten und deren Verwendung zur Behandlung von Tumoren.

5

Beschreibung der Figuren

Fig.1: Schematische Darstellung der Bindung der Fusionsproteine tTF-RGD und tTF-NGR an $\alpha_v\beta_3$ und CD13. Durch die Spezifität der RGD-Sequenz für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und der NGR-Sequenz für CD13 (Aminopeptidase N) wird die Tumorselektivität erreicht. Diese Rezeptoren werden selektiv und spezifisch in hoher Dichte auf Tumor-Endothelzellen exprimiert, nicht aber auf ruhenden Endothelzellen im normalen Gewebe (abgesehen von wenigen Ausnahmen). Die Darstellung der Fusionsproteine ist stark schematisiert und erlaubt keine Aussage hinsichtlich der Primärsequenz.

15

Fig.2: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse von rekombinantem tTF₁₋₂₁₈ und tTF-Fusionsproteinen. Die Reinheit des tTF und der tTF-Fusionsproteine wurde nach Extraktion aus *E.coli* (BL21 DE3) und „refolding“ über einen linearen Harnstoff-Gradienten (6M – 1M) mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-blue-Färbung kontrolliert. Die Identität der Proteine wurde mittels Western-Blot unter Verwendung eines monoklonalen anti-Tissue-Factor-Antikörpers (Klon VIC7, American Diagnostics) verifiziert. Belegung der einzelnen Bahnen: 1=tTF; 2=tTF-RGD; 3=tTF-NGR; 4=tTF-cycloNGR1; 5=tTF-cycloNGR2; 6=tTF-cycloNGR3; 7=tTF-GALNGRSHAG; M = Molekulargewichtsmarker.

20

Fig.3: Bestimmung der Michaeliskonstanten (K_m) für die Aktivierung von FX durch FVIIa/tTF₁₋₂₁₈ bzw. FVIIa/tTF₁₋₂₁₈-Fusionsproteine. Die Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik wurden nach der von Ruf angegebenen Methode berechnet (45).

25

Fig.4: Bindung von tTF, tTF-RGD und tTF-NGR an das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Die Bindung von 0,1 μ M tTF, tTF-RGD und tTF-NGR an immobilisiertes $\alpha_v\beta_3$ wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanen TF (American Diagnostica) in einem ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilbereich dargestellt. Die Unterschiede der Bindung zwischen tTF-RGD und tTF bzw. zwischen tTF-NGR und tTF waren statistisch signifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

30

Fig.5: Spezifität der Bindung von tTF-RGD an das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Die Bindung von tTF-RGD (0,1 μ M) an immobilisiertes $\alpha_v\beta_3$ wurde mittels kompetitiver Inhibition mit dem syntheti-

5

schen Peptid GRGDSP (1-10 μ M) signifikant gehemmt ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test für beide RGD Peptidkonzentrationen).

Fig.6: Bindung von tTF und tTF-RGD an humane Endothelzellen. A: FACS Analyse von Endothelzellen, die mit 0,1 μ M tTF (2) oder mit 0,1 μ M tTF-RGD (3) für 60 min. bei 4°C inkubiert wurden. B: Durch kompetitive Inhibition des tTF-RGD Fusionsproteins mit 1 μ M GRGDSP war eine 75%ige Reduktion der Bindung darstellbar (4). Die Kurven 1 in A und B zeigen die negative Kontrolle.

Fig.7: Inhibition eines als Xenotransplantat in thymuslosen Nackt-Mäusen wachsenden menschlichen Lungenkarzinoms (CCL185) durch intravenöse Therapie mit tTF-Fusionsproteinen (tTF-RGD, n=6; tTF-NGR, n=6) im Vergleich zum Wachstum der Tumoren bei Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, n=8) oder tTF (n=1). Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen mit den jeweiligen Substanzen.

Fig.8: Inhibition und Teilremission eines als Xenotransplantat in thymuslosen Nackt-Mäusen wachsenden menschlichen malignen Melanoms (M21) durch intravenöse Therapie mit tTF-Fusionsproteinen (tTF-RGD, n=3; tTF-NGR, n=3) im Vergleich zum Wachstum der Tumoren bei Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, n=4) oder tTF (n=4). Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen mit den jeweiligen Substanzen.

Fig.9: Makroskopische *in vivo*-Aufnahme einer tumortragenden Maus 20 min. nach Injektion des tTF-NGR Fusionsproteins (A, linke Bildhälfte) bzw. NaCl (A, rechte Bildhälfte). Das makroskopische Bild mit bläulich-livider Verfärbung des Tumors nach Injektion von tTF-NGR deutet auf eine Tumornekrose hin. Nach 60 min. wurden beide Mäuse exsanguiniert, der Tumor *in toto* exstipiert und histologisch untersucht. In B ist die hämorrhagische Imbibierung des mit tTF-NGR behandelten Tumors als Zeichen der sekundären Einblutung infolge der beginnenden Tumornekrose sichtbar. Im Gegensatz hierzu scheint der mit NaCl behandelte Tumor vital zu sein (C).

Fig.10: Histologie des Melanom-Tumors 1 Stunde nach intravenöser Injektion von tTF-RGD (A und B), tTF-NGR (C und D) und Kochsalz (E und F) in die Schwanzvene der tumortragenden Nacktmaus. Die Blutgefäße erscheinen bei den mit den tTF Fusionsproteinen behandelten Tumoren thrombotisch verschlossen (Pfeile). Im Versorgungsgebiet des durch ein Blutgerinnsel verschlossenen Gefäßes können ausgedehnte Tumor-Nekrosen

beobachtet werden (A-D). Photographiert wurden repräsentative Areale der Tumoren (A, C und E: 200fache Vergrößerung, B, D und F 400fache Vergrößerung; HE-Färbung (Färbung z.B. beschrieben in H.C. Burck, Histologische Technik – Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 1982, Seiten 109 ff.).

Fig.11: Repräsentative Histologien von Herz (A), Niere (B), Leber (C) und Lunge (D) 1 Stunde nach Injektion von 4mg/kg KG tTF-NGR. In keinem dieser Organe waren mikroskopisch Thrombosen oder Nekrosen nachweisbar. (HE-Färbung; 200fache Vergrößerung).

Fig.12: Aminosäuresequenz des humanen Gewebefaktors (TF).

Fig.13: Aminosäuresequenz des trunkierten humanen Gewebefaktors tTF₁₋₂₁₈ (im Rahmen der vorliegenden Anmeldung auch kurz als tTF bezeichnet).

Fig.14: Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids tTF-GRGDSP (auch kurz als tTF-RGD bezeichnet).

Fig.15: Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids tTF-GNGRAHA (auch kurz als tTF-NGR bezeichnet).

Fig.16: Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids tTF-GALNGRSHAG.

Fig.17: Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids tTF-GCNGRCG (auch kurz als tTF-cycloNGR1 bezeichnet).

Fig.18: Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids tTF-GCNGRCVSGCAGRC (auch kurz als tTF-cycloNGR2 bezeichnet).

Fig.19: Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids tTF-GCVLNGRMEC (auch kurz als tTF-cycloNGR3 bezeichnet).

Fig.20: Nukleotidsequenz des trunkierten humanen Gewebefaktors tTF₁₋₂₁₈ (im Rahmen der vorliegenden Anmeldung kurz als tTF bezeichnet).

Fig.21: Nukleotidsequenz des Fusionspolypeptids tTF-GRGDSP (auch kurz als tTF-RGD bezeichnet).

Fig.22: Nukleotidsequenz des Fusionspolypeptids tTF-GNGRAHA (auch kurz als tTF-NGR bezeichnet).

5 Fig.23: Nukleotidsequenz des Fusionspolypeptids tTF-GALNGRSHAG.

Fig.24: Nukleotidsequenz des Fusionspolypeptids tTF-GCNGRCG (auch kurz als tTF-cycloNGR1 bezeichnet).

10 Fig.25: Nukleotidsequenz des Fusionspolypeptids tTF-GCNGRCVSGCAGRC (auch kurz als tTF-cycloNGR2 bezeichnet).

Fig.26: Nukleotidsequenz des Fusionspolypeptids tTF-GCVLNGRMEC (auch kurz als tTF-cycloNGR3 bezeichnet).

15

Fig.27: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von tTF₁₋₂₁₈.
A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

Fig.28: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von tTF-GRGDSP.
20 A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

Fig.29: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von tTF-GNGRAHA.
A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

25 Fig.30: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von tTF-GCNGRCG.
A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

Fig.31: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von
tTF-GCNGRCVSGCAGRC. A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

30

Fig.32: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von tTF-GCVLNGRMEC.
A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

Fig.33: Nukleotidsequenz der Oligonukleotide zur Herstellung von tTF-GALNGRSHAG.
35 A: 5'-Primer; B: 3'-Primer.

Fig.34: a: Inhibition und Teilremission eines als Xenotransplantat in thymuslosen Nackt-Mäusen wachsenden menschlichen malignen Melanoms (M21) durch intravenöse Therapie mit tTF-Fusionsproteinen (tTF-RGD, n=7) im Vergleich zum Wachstum der Tumoren bei Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, n=9) oder tTF (n=11). Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen mit den jeweiligen Substanzen.

b: Inhibition eines als Xenotransplantat in thymuslosen Nackt-Mäusen wachsenden menschlichen Fibrosarkoms (HT1080) durch intravenöse Therapie mit tTF-Fusionsproteinen (tTF-RGD, n=12) im Vergleich zum Wachstum der Tumoren bei Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, n=15) oder tTF (n=14). Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen mit den jeweiligen Substanzen.

c: Inhibition eines als Xenotransplantat in thymuslosen Nackt-Mäusen wachsenden menschlichen Lungenkarzinoms (CCL185) durch intravenöse Therapie mit tTF-Fusionsproteinen (tTF-RGD, n=11) im Vergleich zum Wachstum der Tumoren bei Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, n=10) oder tTF (n=5). Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen mit den jeweiligen Substanzen. Die statistische Signifikanz wurde jeweils mit dem Mann-Whitney-Test für unabhängige Gruppen untersucht, wobei P-Werte unter 0,05 als signifikant betrachtet wurden. * gibt die statistische Signifikanz des Unterschieds zwischen tTF-RGD und Puffer an.

Fig.35: Makroskopische Aufnahme einer einen M21-Tumor tragenden Maus nach Ende der Behandlung (Tag 7) mit tTF-RGD Fusionsprotein (A, C) bzw. NaCl (B, D). Der Größenunterschied und das unterschiedliche Erscheinungsbild der tTF-RGD-behandelten Tumoren, die im Gegensatz zu dem vital erscheinenden Kontrolltumor klare Zeichen von Nekrose zeigen, ist deutlich erkennbar.

Fig.36: H-E-Färbung von Tumoren und Organen von mit tTF-RGD und physiologischer Kochsalzlösung behandelten Mäusen

In mit tTF-RGD behandelten Tieren wurde starke Thrombose und Nekrose von Tumorzellen beobachtet (A: 200x, B: 400x). Pfeile zeigen Beispiele der Thrombosen in Blutgefäßen des Tumors. In mit Kochsalzlösung behandelten Tieren tritt keine offensichtliche Thrombose oder Nekrose auf (C: 200x, D: 400x). Pfeile zeigen intakte Blügefäße des Tumors mit einigen Erythrocyten. Herz (E), Lunge (F), Leber (G), und Niere der mit tTF-RGD behandelten Tiere zeigten keine sichtbare Thrombose oder Nekrose.

Fig.37: Wirkung von tTF-NGR in einem Fibrosarkom-Modell

Fibrosarkom (HT1080) tragende Mäuse wurden ohne (pre tTF-NGR) bzw. 6 Stunden nach (post tTF-NGR) i.v. Gabe von tTF-NGR durch Kernspintomographie (MRI) untersucht. Gezeigt ist die hohe (high) oder niedrige (low) vaskuläre Volumenfraktion (Vascular volume fraction).

5

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Diese Probleme aus dem Stand der Technik wurden nunmehr durch Fusionspolypeptide gelöst, die folgende Peptide umfassen:

10

- a) ein Peptid von 3 bis 30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht; und
- b) den Gewebefaktor TF (Tissue Factor) oder ein Fragment davon, wobei der Gewebefaktor und das Fragment dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren können,

15

wobei die Peptide a) und b) entweder unmittelbar oder über einen Linker mit bis zu 15 Aminosäuren aneinander gekoppelt sind und das Peptid, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, an den C-Terminus des Peptids, das die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, gekoppelt ist. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, welche entsprechende Fusionspolypeptide enthalten und deren Verwendung zur Behandlung von Tumoren.

20

25

Die erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide können neben den Sequenzen a) und b) weitere Sequenzen umfassen, soweit diese die sterische Konformation des Fusionspolypeptids nicht beeinträchtigen und die Bildung des die Blutgerinnung auslösenden Enzym- und Substratkomplexes nicht hindern. Die erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide können beispielsweise die Sequenzen eines His-Tags enthalten, welche die rekombinante Expression und Reinigung des Peptids vereinfachen (vgl. Beispiele). Die Gegenwart dieser Sequenzen ist jedoch nicht notwendig. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besteht das Fusionspolypeptid daher aus:

30

- a) einem Peptid von 3 bis 30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht; und

35

b) dem Gewebefaktor TF (Tissue Factor) oder einem Fragment davon, wobei der Gewebefaktor und das Fragment dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren können,

5 wobei die Peptide a) und b) entweder unmittelbar oder über einen Linker mit bis zu 15 Aminosäuren aneinander gekoppelt sind. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besteht das Fusionspolypeptid aus:

10 a) einem Peptid von 3 bis 30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht; und

b) dem Gewebefaktor TF (Tissue Factor) oder einem Fragment davon, wobei der Gewebefaktor und das Fragment dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren können,

15 wobei die Peptide a) und b) aneinander gekoppelt sind.

Erfindungsgemäß konnte somit überraschenderweise gezeigt werden, daß Fusionspolypeptide aus einem besonders kleinen Peptid, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht und einem Peptid, das die Blutgerinnung bei der Bindung
20 des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, für die antivaskuläre Tumorthherapie besonders vorteilhaft sind. Die geringe Größe des Polypeptides, das die Bindung an die Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, verbessert die Ausrichtung des Fusionsproteins zur Phospholipidmembran der Endothelzelle. Die Bildung des für die Blutgerinnung wesentlichen Enzym-/Substratkomplexes wird nicht sterisch behindert und der Gewebefaktor TF, der die Blutgerinnung
25 aktivieren kann, erfährt keine Konformationsveränderung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem Peptid, das die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann um den Gewebefaktor TF mit der in SEQ ID NO:1 (Fig. 12) dargestellten Aminosäure-Sequenz. Erfindungsgemäß sind ferner Gewebefaktor-Sequenzen umfaßt, die eine Aminosäure-Homologie von mindestens 70% oder mindestens 80% zu der SEQ ID NO:1 (Fig. 12) aufweisen, wobei Sequenzen mit einer Homologie von mindestens 95 % besonders bevorzugt sind. Die Bestimmung des Homologiegrades erfolgt, indem man die beiden Sequenzen übereinander schreibt, wobei vier Lücken auf einer Länge von 100 Aminosäuren möglich sind, um größtmögliche Übereinstimmung der zu vergleichenden Sequenzen zu erzielen (vgl. auch Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, 124, 1972). Anschließend wird der Prozentsatz der Ami-
35

nosäurereste der kürzeren der beiden Aminosäureketten ermittelt, der identischen Aminosäureresten auf der anderen Kette gegenübersteht.

Das Peptid, das die Blutgerinnung in Tumorgefäßen bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, kann ferner ein Fragment des Gewebefaktors TF oder ein Fragment einer zu TF homologen Sequenz sein. Vorzugsweise weist das Fragment die in SEQ ID NO:2 (Fig. 13) dargestellte Sequenz auf. Die in SEQ ID NO:2 (Fig. 13) dargestellte Sequenz (tTF₁₋₂₁₈ oder kurz tTF) umfaßt die N-terminalen 218 Aminosäuren von TF. Ferner können erfindungsgemäß auch Fragmente von tTF verwendet werden, denen gegenüber tTF mehrere Aminosäuren am N-Terminus oder C-Terminus fehlen. Beispielsweise können Fragmente verwendet werden, denen bis zu 10 Aminosäuren am N-Terminus fehlen (tTF₁₁₋₂₁₈). Des weiteren können Fragmente verwendet werden, denen bis zu 8 Aminosäuren am C-Terminus fehlen (tTF₁₋₂₁₀), wie z.B. (tTF₁₋₂₁₄).

Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionspolypeptide, in denen das Peptid, das eine selektive Bindung an die Endothelzellen der Tumorgefäße ermöglicht, an den C-Terminus des Peptids gekoppelt ist, das die Blutgerinnung aktivieren kann. Unter „Tumorgefäßendothelzellen“ bzw. „Endothelzellen in Tumorgefäßen“ werden dabei erfindungsgemäß Zellen verstanden, die die Blutgefäße in einem Tumor auskleiden. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß diese Anordnung eine Ausrichtung des Fusionsproteins senkrecht zur Phospholipidmembran der Endothelzelle gewährleistet, welche für die Auslösung der Blutgerinnung besonders vorteilhaft ist. Diese Orientierung entspricht der natürlichen Ausrichtung des TF bei der Induktion der Blutgerinnung. Wie in Figur 3 gezeigt, ergeben sich für alle so hergestellten Konstrukte bezüglich der Aktivierung von Faktor X durch FVIIa/tTF₁₋₂₁₈ bzw. FVIIa/tTF₁₋₂₁₈-Fusionsproteine sehr ähnliche Michaelis-Menten-Kinetiken. Demgegenüber wurde im Stand der Technik das die Gerinnung aktivierende Peptid an den C-Terminus des Targeting-Moleküls gekoppelt (vgl. (16)). Die erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide unterscheiden sich somit grundsätzlich von denen im Stand der Technik genannten Peptiden.

Das Peptid, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, kann ein beliebiges Peptid sein, das eine Länge von 3 – 30 Aminosäuren aufweist und Tumorgefäßendothelzellen mit hoher Spezifität bindet. Entsprechende Peptide können aus Peptidbibliotheken durch im Stand der Technik übliche Verfahren isoliert werden. Sie können – je nach gewählter Peptidbibliothek – eine lineare oder cyclische Struktur aufweisen.

5

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die Peptide, die eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglichen, die

Aminosäuresequenz RGD oder NGR. Beide Sequenzen waren im Stand der Technik für Ihre spezifische Bindung an Integrine, insbesondere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine (RGD-Peptide), sowie als Zelladhäsionsmotive (NGR-Peptide) bekannt (vgl. (8)). Erfindungsgemäß wurde nunmehr überraschenderweise gezeigt, daß diese Peptide insbesondere dazu geeignet sind, Teil eines Fusionspolypeptides zu sein, dessen anderer Teil ein Peptid ist, das die Blutgerinnung in Tumoren bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann.

Besonders vorteilhafte Wirkungen wurden mit den linearen Peptiden mit den Sequenzen GRGDSP, GNGRAHA und GALNGRSHAG und den zyklischen Peptiden mit den Sequenzen GCNGRCG, GCNGRCVSGCAGRC und GCVLNGRMEC erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß Fusionspolypeptide, welche diese Sequenzen und die Sequenz der ersten 218 Aminosäuren von humanem TF umfassen, in hohem Maße für die antivaskuläre Tumorthherapie geeignet sind. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß diese Fusionspolypeptide das Wachstum von Tumoren signifikant hemmen oder die Tumoren in Ihrer Größe reduzieren (siehe Fig. 7 und 8). Die beobachtete Induktion einer Teilremission der Tumoren (vgl. Fig. 8) verweist aufgrund der hohen Vorhersagekraft des Mausmodells (42, 43, 44) auf die zu erwartenden positiven Resultate bei der humanen Tumorthherapie.

Weiterhin umfaßt die Erfindung auch Fusionsproteine mit zyklischen RGD-Peptiden, da durch die Zyklisierung die Affinität für Integrine verstärkt wird (wie beispielsweise in der Veröffentlichung 21 beschrieben).

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Fusionspolypeptide, die eine der in SEQ ID NO:3-8 (Fig. 14-19) dargestellten Sequenzen aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuren, die für ein Fusionspolypeptid, wie oben beschrieben, kodieren. Entsprechende Nukleinsäuren können beispielsweise eine der in SEQ ID NO: 10-15 (Fig. 21-26) dargestellten Sequenzen aufweisen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, welche eine der oben genannten Nukleinsäuren umfassen. Entsprechende Vektoren umfassen üblicherweise ferner regulatorische Sequenzen für die Expression der Nukleinsäure. Solche Vektoren sind im Stand der Technik umfassend beschrieben und können von einer Vielzahl von Firmen kommerziell erworben werden.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Zellen, welche eine der genannten Nukleinsäuren oder Vektoren enthalten. Die Zellen werden üblicherweise für die

Expression der Nukleinsäure und die rekombinante Herstellung der erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide verwendet. Für diesen Zweck können eine Vielzahl von Zellen zum Einsatz gelangen, darunter *E.coli*, Hefezellen und tierische Zelllinien, wie CHO- oder COS-Zellen. Entsprechende Zellen und deren Verwendung sind im Stand der Technik umfassend beschrieben.

5

Die erfindungsgemäßen Polypeptide nach Anspruch 1 können darüber hinaus auch durch andere geeignete Verfahren hergestellt werden, beispielsweise durch chemische Kopplung einzelner Peptide. So lassen sich einzelne Peptide nach im Stand der Technik üblichen Verfahren herstellen, z.B. durch chemische Synthese oder mittels heterologer Expression, und anschließend mittels

10 Kopplung aneinanderfügen.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch Arzneimittel, welche die oben beschriebenen Fusionspolypeptide, Nukleinsäuren, Vektoren oder Zellen umfassen. Die Arzneimittel können ferner pharmazeutisch verträgliche Träger, Hilfsmittel oder Adjuvantien umfassen. Ferner können die Polypeptide in einem solchen Arzneimittel in einem modifizierten Zustand vorliegen, z.B. pegyliert, d.h. gekoppelt an ein Polyäthylenglykolkolmolekül.

15

Die erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide bzw. diese Fusionspolypeptide enthaltende Arzneimittel werden für die Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere für die antivaskuläre Tumorthherapie verwendet. Als Tumorerkrankungen, die sich mit Hilfe der erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide bzw. diese Fusionspolypeptide enthaltener Arzneimittel behandeln lassen, kommen beispielsweise Bronchialkarzinome und andere Tumoren des Thorax und des Mediastinums, Mammakarzinome und andere gynäkologische Tumoren, kolorektale Karzinome, Pankreaskarzinome und andere Tumoren des Gastrointestinaltraktes, maligne Melanome und andere Tumoren der Haut, Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, Prostatakarzinome und andere Urogenitaltumoren, Sarkome, endokrin-aktive Tumoren, Leukämien und Myelodysplastische Syndrome sowie Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome in Betracht.

20

25

Ferner können auch gutartige Tumoren, wie beispielsweise Hämangiome, und die Gefäßneubildung bei der diabetischen Retinopathie behandelt werden.

30

Neben der intravenösen Verabreichung ist auch die subkutane und intraperitoneale Verabreichung der Fusionspolypeptide bzw. Arzneimittel möglich. Durch Verpackung in pharmazeutische Vehikel, die eine Spaltung der Fusionspolypeptide im Magen-Darm-Trakt verhindert, wäre es darüber hinaus auch möglich, die Fusionspolypeptide bzw. Arzneimittel oral zu verabreichen.

5

Vorteilhaft kann weiterhin eine Kombination der Verabreichung der erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide mit anderen therapeutischen Ansätzen, z.B. einer cytotoxischen Chemotherapie oder Bestrahlung, sein. Auch eine Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. eine Kombination mit Faktor VIIa oder Doxycyclin ist möglich, bevorzugt ist eine Kombination des erfindungsgemäßen Polypeptids mit Faktor VIIa oder Doxycyclin jedoch nicht notwendig.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiele

Beispiel 1: Expression und Reinigung von tTF und tTF-Fusionsproteinen

Die für die N-terminalen 218 Aminosäuren des Gewebefaktors TF (im folgenden als tTF bezeichnet) kodierende cDNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der in SEQ ID NO:16 und SEQ ID NO:17 (Fig. 27) synthetisiert und in den Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen) kloniert. Die rekombinanten Plasmide wurden in E. coli (BL21) transformiert, exprimiert und gereinigt (Qiagen Plasmid Kit).

Neben dem trunkierten Gewebefaktor tTF wurden tTF-Peptid-Fusionsproteine konstruiert, in denen die Targeting-Peptide zunächst an das carboxyterminale Ende des löslichen Gewebefaktors tTF gebunden sind. Es wurden folgende lineare Fusionsproteine konstruiert:

tTF-GRGDSP (SEQ ID NO:3; Fig.14; im folgenden als tTF-RGD bezeichnet; es wurden die PCR-Primer SEQ ID NO:18 und SEQ ID NO:19 (Fig. 28) verwendet);

tTF-GNGRAHA (SEQ ID NO:4; Fig.15; im folgenden als tTF-NGR bezeichnet; es wurden die PCR-Primer SEQ ID NO:20 und SEQ ID NO:21 (Fig.29) verwendet);

tTF-GALNGRSHAG (SEQ ID NO:5; Fig.16; es wurden die PCR-Primer SEQ ID NO:28 und SEQ ID NO:29 (Fig. 33) verwendet);

Darüber hinaus wurden die folgenden cyclischen Fusionsproteine synthetisiert:

tTF-GCNGRCG (SEQ ID NO:6; Fig.17; im folgenden als tTF-cycloNGR1 bezeichnet; es wurden die PCR-Primer SEQ ID NO:22 und SEQ ID NO:23 (Fig.30) verwendet),

tTF-GCNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO:7; Fig.18; im folgenden als tTF-cycloNGR2 bezeichnet; es wurden die PCR-Primer SEQ ID NO:24 und SEQ ID NO:25 (Fig.31) verwendet),

tTF-GCVLNGRMEC (SEQ ID NO:8; Fig.19; im folgenden als tTF-cycloNGR3 bezeichnet; es wurden die PCR-Primer SEQ ID NO:26 und SEQ ID NO:27 (Fig.32) verwendet)

Alle Konstrukte (einschließlich tTF) wurden in dem Vektor pET30a(+) exprimiert, der die zusätzliche Expression eines N-terminalen „Affinitäts-Tag“ aus 6 Histidin-Resten und wenigen Vektor-kodierten Aminosäuren vermittelt. Mit Hilfe dieses Affinitäts-Tags konnten die Konstrukte durch Affinitätschromatographie über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure Säule (Ni-NTA, Novagen) gereinigt werden. Der Affinitäts-Tag ist in SEQ ID NO:30 dargestellt. SEQ ID NO:31 und SEQ ID NO:32 zeigen exemplarisch die vollständigen Aminosäuresequenzen von tTF-GRGDSP und tTF-GNGRAHA mit Affinitäts-Tag.

Die Konstrukte wurden so gewählt, daß auf der Basis der bekannten Röntgenkristallstruktur des tTF:FVIIa-Komplexes (19) eine senkrechte Ausrichtung des tTF-Fusionsproteins zur Phospholipidmembran der Endothelzelle gewährleistet wird, was der Ausrichtung des nativem TF entspricht. Andererseits wurde berücksichtigt, daß aus der gewählten Struktur keine sterische Behinderung von tTF für die Interaktion mit FVIIa und dem makromolekularen Substrat FX entstehen soll. Durch die Spezifität der RGD-Sequenz für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und der NGR-Sequenz für CD13 (Aminopeptidase N) wird eine Tumorselektivität erreicht, da diese Rezeptoren selektiv und spezifisch in hoher Dichte auf Tumor-Endothelzellen, aber von wenigen Ausnahmen abgesehen, nicht auf ruhenden Endothelzellen im normalen Gewebe exprimiert werden (siehe Figur 1).

tTF und die beschriebenen Fusionsproteine tTF-RGD, tTF-NGR, tTF-GALNGRSHAG und tTF-cycloNGR1-3 wurden mittels pET30a(+) in *E. coli* (BL21) transformiert und exprimiert. Transformierte, mit IPTG induzierte *E. coli* BL21 DE3 wurden zentrifugiert und in 5-7 ml Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, pH7,5; 150 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$; 10 μ g/ml Aprotinin; 2 mg/ml Lysozym)/g Pellet aufgenommen und 20 μ l Benzonase (Novagen) hinzugefügt. Nach 90 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und einer Zentrifugation bei 12 000 g, 20 min, 4°C, wurde das Pellet resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung in Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 3% Triton X-100) homogenisiert. "Inclusion bodies" wurden über Nacht bei RT in 2-4 ml /g Pellet an denaturierendem Puffer (6 M Guanidiniumchlorid, 0,5 M NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 , 1 mM DTT) gelöst. Der Überstand einer Zentrifugation (5 000 g, 30 min, 4°C) wurde mit einem 0,22 μ m-Filter filtriert. Die Konstrukte wurden über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure Säule (Ni-NTA, Novagen) über die zusätzlich eingeführten His-Tag Sequenzen des Konstrukts bis zur Homogenität gereinigt. Die Reinigung und Faltung der Proteine wurde mit dem His Bind Buffer Kit (Novagen) durchgeführt. Anschließend wurde gegen TBS-Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) dialysiert.

Durch SDS-PAGE, Western Blot und Massenspektroskopie Analysen konnte die Identität der Proteine bestätigt werden (siehe Figur 2).

5 Beispiel 2: Funktionelle Charakterisierung von tTF und tTF-Fusionsproteinen

Die funktionelle Aktivität dieser Fusionsproteine hinsichtlich Kofaktoraktivität bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa durch Faktor VIIa konnte in vitro durch Michaelis-Menten Analysen gezeigt werden. Die Fähigkeit von tTF bzw. der tTF-Fusionspolypeptide, die spezifische proteolytische Aktivierung von FX durch FVIIa in Anwesenheit von Phospholipiden zu verstärken, wurde in einer leichten Modifikation nach der von Ruf beschriebenen Methode bestimmt (45). Hierzu wurden je 20 µl der folgenden Reagenzien in Mikrotiter-Platten pipettiert: (a) 50 nM rekombinanter FVIIa (Novo-Nordisk) in TBS-BSA; b) 0,16 nM – 1,6 µM tTF/tTF-Fusionspolypeptid in TBS-BSA; (c) 25 mM CaCl₂ und 500 µM Phospholipidvesikel (Phosphatidylcholin / Phosphatidylserin, 70/30, M/M; Sigma). Nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 20 µl des natürlichen Substrats FX (Enzyme Research Laboratories) in einer Konzentration von 5 µM hinzugegeben. Anschließend wurde eine Probe in minütlichen Abständen abpipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 mM EDTA-Lösung gestoppt. Die gebildete Menge an FXa wurde durch Zugabe des chromogenen Substrats Spectrozym FXa in einem Microplate Reader durch Bestimmung der Absorptionsänderung bei 405 nm gemessen und die Parameter für die Michaelis-Menten-Kinetik nach der von Ruf angegebenen Methode analysiert. Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl tTF als auch die tTF-Fusionspolypeptide unter diesen Bedingungen funktionell aktiv sind (Fig. 3). Die ermittelten Michaeliskonstanten (Km) der Fusionspolypeptide lagen zwischen 0,12 – 1,2 nM (Fig. 3), somit im unteren Bereich, welcher für tTF publiziert wurde. Somit kann angenommen werden, daß durch die Fusionierung von tTF mit den Peptiden die funktionelle Aktivität unbeeinflusst bleibt.

Beispiel 3: Bindung der tTF-Fusionsproteine an $\alpha_v\beta_3$ in vitro und in vivo

Die Bindung von tTF-RGD und tTF-NGR an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ konnte in einem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) demonstriert werden, indem gereinigtes $\alpha_v\beta_3$ an Mikrotiterplatten immobilisiert worden war (siehe Figur 4). Die Spezifität der Bindung von tTF-RGD an $\alpha_v\beta_3$ wird dadurch unterstrichen, daß das synthetische Peptid mit der Sequenz GRGDSP (Fa. Gibco) die Bindung von tTF-RGD an $\alpha_v\beta_3$ in diesem Testsystem kompetitiv inhibiert (siehe Figur 5).

Anschließend wurde die spezifische Bindung von tTF-RGD an $\alpha_v\beta_3$ auf Endothelzellen evaluiert. Hierzu wurde die differentielle Bindung von biotinyliertem tTF und tTF-RGD an Endothelzellen

in Suspension mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analysiert. Hierbei macht man sich experimentell zu Nutze, daß alle in Gewebekultur gehaltenen Endothelzellen aktiviert sind, d.h. $\alpha_v\beta_3$ -Moleküle exprimieren. Dies läßt sich mittels verschiedener immunhistochemischer Verfahren nachweisen. Eine kultivierte Endothelzelle entspricht somit hinsichtlich ihres

5 Expressionsmusters in Bezug auf $\alpha_v\beta_3$ einer Tumorendothelzelle. Demgemäß läßt sich eine kultivierte Endothelzelle als Modellsystem für die spezifische Bindung von Substanzen an Tumorendothelzellen nutzen und ermöglicht ferner Aussagen über die zu erwartende Toxizität.

Als Detektionsmethode wurde Streptavidin-Phycoerythrin benutzt. Die gemessene Fluoreszenzintensität lag bei tTF-RGD um den Faktor acht höher als für tTF (Figur 6A). Ferner konnte die Bindung von 0,1 μ M tTF-RGD an Endothelzellen kompetitiv durch die Gabe von 1 μ M des synthetischen Peptids GRGDSP um 75% gesenkt werden (Figur 6B). Dies unterstreicht die Spezifität der Bindung von tTF-RGD an RGD-bindende Rezeptoren auf der Endothelzelloberfläche wie $\alpha_v\beta_3$.

Beispiel 4: Anti-Tumor Wirkung der tTF-Fusionsproteine im Tiermodell

Die Fusionsproteine tTF-RGD und tTF-NGR wurden hinsichtlich ihrer Wirkungen und Nebenwirkungen an Xenotransplantaten menschlicher Tumoren in thymuslosen Nacktmäusen evaluiert.

20 Hierzu wurden die in unserem Labor etablierten Modelle verwendet (33, 34). Die Zelllinien CCL185 (humanes Adenokarzinom der Lunge) bzw. M-21 (humanes Melanom) wurden subkutan in die Flanke männlicher BALB/c/Nackt-Mäuse (9-12 Wochen alt) injiziert. Nach Erreichen eines Tumolvolumens von etwa 50-100 mm³ (CCL185) bzw. 400-600 mm³ (M-21) wurden die Mäuse randomisiert vier Gruppen zugeordnet. Gruppe 1 erhielt nur physiologische Kochsalzlösung (NaCl), Gruppe 2 tTF, Gruppe 3 tTF-RGD, Gruppe 4 tTF-NGR (jeweils 1,5-2,0 mg/kg Körpergewicht (KG) des Proteins). Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene der Tiere in 1-3 täglichen Intervallen (in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie). Hier zeigte sich eine erhebliche therapeutische Aktivität der Fusionsproteine. Die Tumoren der mit tTF-RGD bzw. tTF-NGR Fusionsproteinen behandelten Mäuse wurden im Vergleich zu tTF

25 oder NaCl in ihrem Wachstum signifikant gehemmt oder in ihrer Größe bis hin zu einer Teilremission reduziert (siehe Figuren 7 und 8).

Um den Wirkungsmechanismus der Thrombosierung von Tumorgefäßen zu belegen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Hierzu wurde die humane Melanom Zelllinie in die Flanke

35 von zwei männlichen Balb/c/Nacktmäusen injiziert. Bei Erreichen einer Tumorgroße von ca. 500 mm³ wurden 2,0 mg/kg KG tTF-NGR oder NaCl in die Schwanzvene injiziert. Figur 9A zeigt eine makroskopische in vivo Aufnahme der tumortragenden Maus 20 min. nach Injektion des tTF-NGR Fusionsproteins (linke Bildhälfte) bzw. NaCl (rechte Bildhälfte). Das makroskopische

Bild mit bläulich-livider Verfärbung des Tumors nach Injektion von tTF-NGR deutet auf eine Tumornekrose hin. Nach 60 min. wurden die Mäuse exsanguiniert, der Tumor in toto exstipiert und histologisch untersucht. In Figur 9B ist die hämorrhagische Imbibierung des mit tTF-NGR behandelten Tumors als Zeichen der sekundären Einblutung infolge der beginnenden Tumornekrose sichtbar. Im Gegensatz hierzu scheint der mit NaCl behandelte Tumor vital zu sein (Figur 9C).

Die histologische Untersuchung des Melanom-Tumors zeigt mikroskopisch sichtbare Thrombenbildung in den Blutgefäßen (Figur 10A-D). Durch diesen Befund wird der angenommene anti-Tumor-Wirkungsmechanismus von tTF-NGR, d.h. die Induktion von Thromben in den Blutgefäßen, belegt. Die hohe Selektivität von tTF-NGR für Tumorblutgefäße wird durch den fehlenden histologischen Nachweis von Gerinnsel- und Nekrosenbildung im normalen Gewebe wie Herz, Niere, Leber und Lunge demonstriert (Figur 11A-D). Selbst repetitive hohe Dosen von tTF-NGR (4mg/kg KG) führten zu keinerlei sichtbarer Thrombenbildung oder Organtoxizität.

Beispiel 5: Anti-Tumor Wirkung der tTF-Fusionsproteine im HT1080-Tumor-Tiermodell

Die Antitumoraktivität des tTF-RGD-Fusionsproteins wurde ferner in BALB/c/Nackt-Mäusen mit Fibrosarkomen (HT1080) untersucht. Diese Tumore wachsen schnell und sind gut vaskularisiert. Die Ergebnisse zweier Experimente sind in Tabelle 2 und Figur 34 zusammengefaßt. Nach der zweiten Injektion von tTF-RGD wurde im Vergleich zu Kontrollgruppen eine signifikante Wachstumsinhibition der HT1080 Tumore beobachtet. Dieser Effekt hielt bis zum Ende des Experiments an Tag 7 an ($P=0,021$ für tTF-RGD gegenüber der Puffer-Kontrolle (physiologische Kochsalzlösung), $P=0,005$ für tTF-RGD gegenüber tTF). Ähnlich wie bei den früheren Experimenten wurde eine Teilregression des Tumolvolumens in diesem Modell beobachtet.

Tabelle 1:

Wirkung von tTF-RGD auf das Wachstum von M21-Tumoren in Mäusen

Behandlung	Durchschnittliches Tumolvolumen (mm ³)		P ggü. Puffer	P ggü. tTF	n
	Tag 0	Tag 7			
Puffer	590 +/-77	994 +/-140		ns	9
tTF	558+/-47	931+/-147	ns		11
tTF-RGD	585+/-85	514+/-81	<0,01	<0,05	7

ns: nicht signifikant

Tabelle 2:

Wirkung von tTF-RGD auf das Wachstum von HT1080-Tumoren in Mäusen

Behandlung	Durchschnittliches Tumorumfugen (mm ³)		P ggü. Puffer	P ggü. tTF	n
	Tag 0	Tag 7			
Puffer	1671+/-296	2431+/-559		ns	15
tTF	1751+/-269	2335+/-398	ns		14
tTF-RGD	1725+/-197	1241+/-122	<0,05	<0,01	12

ns: nicht signifikant

5 Tabelle 3:

Wirkung von tTF-RGD auf das Wachstum von CCL185-Tumoren in Mäusen

Behandlung	Durchschnittliches Tumorumfugen (mm ³)		P ggü. Puffer	P ggü. tTF	n
	Tag 0	Tag 7			
Puffer	39+/-3	467+/-137		ns	9
tTF	44+/-8	764+/-148	ns		5
tTF-RGD	45+/-5	130+/-19	<0,01	<0,01	10

ns: nicht signifikant

10 Weitere tTF-Fusionsproteine können vom Fachmann auf der Basis der Offenbarung der vorliegenden Erfindung problemlos konstruiert werden. Potentielle Kandidaten sind die Peptide TAASGVRSMDH und LTLRWVGLMS, welche an NG 2 binden, das murine Homolog des humanen Melanom Proteoglykans (12). Die Expression von NG 2 ist beschränkt auf Tumorzellen und angiogenen Gefäßen eines Tumors (35). Ein weiterer Kandidat ist das synthetische Peptid TTHWGFTL, welches selektiv und potent die Matrix-Metallo-Proteinase-2 (MMP-2) inhibiert

15 (13). Da das Integrin $\alpha\beta 3$ offenbar auch die MMP-2 in einer RGD unabhängigen Weise bindet, wird hierdurch das aktive Enzym an die Oberfläche der angiogenen Blutgefäße lokalisiert (36). Ein Konstrukt bestehend aus tTF und diesem MMP-2 inhibitorischen Peptid könnte ebenfalls die selektive Bindung von tTF₁₋₂₁₈ an die Endothelzellmembran von Tumorgefäßen vermitteln.

20

Literatur

1. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989
2. Dvorak HJ, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ: Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors – Concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 174: 1275-1278, 1991

25

3. Dvorak HJ, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039, 1995
- 5 4. Terman BJ, Dougher-Vermazen M: Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metastasis Rev* 15: 159-163, 1996
- 10 5. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdaz AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE: Upregulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: Implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1: 1623-1634, 1995
- 15 6. Rettig WJ, Garinchesa P, Healey JH, Su SL, Jaffe EA, Old LJ: Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10832-10836, 1992
7. Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra MR, Bigotti A, Natali PG: A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 108: 1139-1148, 1989
- 20 8. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E: Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377-380, 1998
- 25 9. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Peruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M: Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13612-13617, 1997
- 30 10. Olson TA, Mohanraj D, Roy S, Ramakrishnan S: Targeting the tumor vasculature: inhibition of tumor growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int J Cancer* 73: 865-870, 1997
- 35 11. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH: CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97: 652-659, 2001
- 40 12. Burg MA, Pasqualini R, Arap W, Ruoslahti E, Stallcup WB: NG2 Proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 59: 2869-2874, 1999
- 45 13. Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkila P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R: Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol* 17: 768-774, 1999
- 50 14. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, Thorpe PE: Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 275: 547-550, 1997
- 55 15. Ran S, Gao B, Duffy S, Watkins L, Rote N, Thorpe PE: Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Cancer Res* 58: 4646-4653, 1998
16. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D: Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res* 61: 711-716, 2001
17. Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El-Sheikh A, Vessella R, Edgington TS: Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 62: 5470-5475, 2002

18. Gottstein C, Wels W, Ober B, Thorpe PE: Generation and characterisation of recombinant vascular targeting agents from hybridoma cell lines. **BioTechniques** 30: 190-200, 2001
- 5 19. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC: Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. **Blood** 81: 734-744, 1993
- 10 20. Banner DW, D'Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. **Nature** 380: 41-46, 1996
- 15 21. Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E: Selection of peptides binding to the $\alpha_5\beta_1$ integrin from phage display library. **J Biol Chem** 268: 20205-20210, 1993
22. Healy JM, Murayama O, Maeda T, Yoshino K, Sekiguchi K, Kikuchi M: Peptide ligands for integrin $\alpha_v\beta_3$ selected from random phage display libraries. **Biochemistry** 34: 3948-3955, 1995
- 20 23. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. **Cancer Res** 60: 722-727, 2000
- 25 24. Curnis F, Sacchi A, Borgna L, Magni F, Gasparri A, Corti A: Enhancement of tumor necrosis factor α antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD 13). **Nature Biotechnology** 18: 1185-1190, 2000
- 30 25. Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, Del Rio G, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE, Pasqualini R: Anti-cancer activity of targeted proapoptotic peptides. **Nature Med** 5: 1032-1038, 1999
26. Ruoslahti E: Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. **Cancer Biol** 10: 435-442, 2000
- 35 27. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. **Cancer Res** 60: 722-727, 2000
- 40 28. Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, Fischetti L, Arap W, Pasqualini R, Corti A: Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. **Cancer Res** 62: 867-874, 2002
- 45 29. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M: Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 13612-13617, 1997
30. Yun Z, Menter DG, Nicolson GL: Involvement of integrin $\alpha_v\beta_3$ in cell adhesion, motility and liver metastasis of murine RAW117 large cell lymphoma. **Cancer Res** 56: 3103-3111, 1996
- 50 31. Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA: Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. **Science** 264: 569-571, 1994
- 35 32. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA: Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell** 92: 391-400, 1998

33. Topp MS, Koenigsmann M, Mire-Sluis A, Oberberg D, Eitelbach F, von Marschall Z, Notter M, Reufi B, Stein H, Thiel E, Berdel WE: Recombinant human interleukin-4 inhibits growth of some human lung tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*. **Blood** 82: 2837-2844, 1993
- 5 34. Topp MS, Papadimitriou CA, Eitelbach F, Koenigsmann M, Oelmann E, Koehler B, Oberberg D, Reufi B, Stein H, Thiel E, Berdel WE: Recombinant human interleukin 4 has antiproliferative activity on human tumor cell lines derived from epithelial and non-epithelial histologies. **Cancer Res** 55: 2173-2176, 1995
- 10 35. Schrappe M, Klier FG, Spiro RC, Gladson CL: Correlation of chondroitin sulfate proteoglycan expression on proliferating brain capillary endothelial cells with the malignant phenotype of astroglial cells. **Cancer Res** 51: 4986-4993, 1991
- 15 36. Brooks PC: Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. **Cell** 85: 683-693, 1996
37. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA: Disruption of Angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. **Cell** 92: 391-400, 1998
- 20 38. Schnurch H, Risau W: Expression of tie2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinase in the endothelial cell lineage. **Development** 119: 957-968, 1993
- 25 39. Peters KG, Coogan A, Berry D, Marks J, Iglehart JD, Kontos CD, Rao P, Sankar S, Trogan E: Expression of tie2/tek in breast tumor vasculature provides a new marker for evaluation of tumor angiogenesis. **Br J Cancer** 77: 51-56, 1998
- 30 40. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell** 87: 1171-1180, 1996
- 35 41. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TH, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science** 277: 55-60, 1997
- 40 42. Scholz CC, Berger DP, Winterhalter BR, Henß H, Fiebig HH: Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumour xenografts. **Eur J Cancer** 26: 901-905, 1990
43. Fiebig HH, Berger DP, Dengler WA, Wallbrecher E, Winterhalter BR: Combined in vitro/in vivo test procedure with human tumor xenografts for new drug development. **Contrib. Oncol. Basel, Karger** 42: 321-351, 1992.
- 45 44. Fiebig HH, Burger AM: Human tumor xenografts and explants. **Tumor Models in Cancer Research**, eds B.A. Teicher, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002.
- 50 45. Ruf W, Rehemtulla A, Edgington TS: Phospholipid-independent and -dependent Interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. **J Biol Chem** 266: 2158-2166, 1991.
- 55 46. Hu P, Yan J, Sharifi J, Bai T, Khawla LA, Epstein AL: Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis. **Cancer Research** 63: 5046-5053.

Patentansprüche

1. Fusionspolypeptid, umfassend

5 a) ein Peptid von 3 bis 30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht; und

b) den Gewebefaktor TF (Tissue Factor) oder ein Fragment davon, wobei der Gewebefaktor und das Fragment dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Blutgerinnung
10 bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren können,

wobei die Peptide a) und b) entweder unmittelbar oder über einen Linker mit bis zu 15 Aminosäuren aneinander gekoppelt sind, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid, das
15 eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, an den C-Terminus des Peptids, das die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, gekoppelt ist.

2. Fusionspolypeptid nach Anspruch 1, bestehend aus

20 den Peptiden a) und b) und einem Linker mit bis zu 15 Aminosäuren.

3. Fusionspolypeptid nach Anspruch 1,

wobei die Peptide a) und b) unmittelbar aneinander gekoppelt sind.

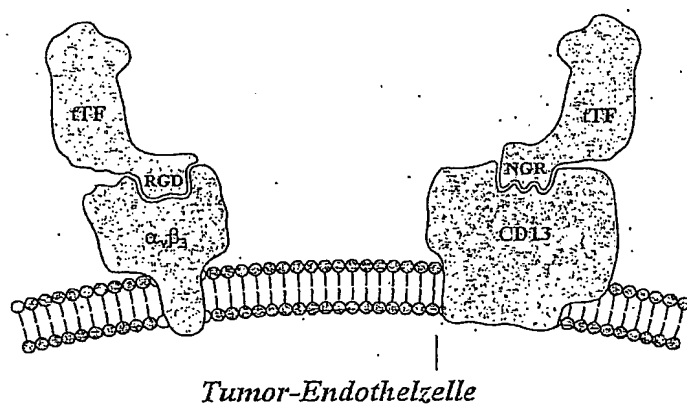
4. Fusionspolypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das
25 Peptid, das die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, der Gewebefaktor TF ist, der die in SEQ ID NO:1 dargestellte Sequenz aufweist.5. Fusionspolypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das
30 Peptid, das die Blutgerinnung bei Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen aktivieren kann, ein Fragment des Gewebefaktors TF ist, das vorzugsweise die in SEQ ID NO:2 dargestellte Sequenz aufweist.6. Fusionspolypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das
35 Peptid von 3 bis 30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, eine lineare oder cyclische Struktur aufweist.

7. Fusionspolypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid von 3 bis 30 Aminosäuren, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, die Aminosäuresequenz RGD oder NGR umfaßt
- 5 8. Fusionspolypeptid nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, aus der Gruppe bestehend aus GRGDSP und GNGRAHA ausgewählt wird.
- 10 9. Fusionspolypeptid nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid, das eine selektive Bindung des Fusionspolypeptides an Tumorgefäßendothelzellen ermöglicht, aus der Gruppe bestehend aus GCNGRCG, GCNGRCVSGCAGRC, GCVLNGRMEC und GALNGRSHAG ausgewählt wird.
- 15 10. Fusionspolypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der in SEQ ID NO:3-8 dargestellten Sequenzen aufweist.
11. Nukleinsäure, die für ein Fusionspolypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert.
- 20 12. Nukleinsäure nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine der in SEQ ID NO:10-15 dargestellten Sequenzen aufweist.
13. Vektor, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 11 oder 12 umfaßt.
- 25 14. Zelle, die eine Nukleinsäure nach Anspruch 11 oder 12 oder einen Vektor nach Anspruch 14 umfaßt.
- 30 15. Arzneimittel, das ein Fusionspolypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10, eine Nukleinsäure nach Anspruch 11 oder 12, einen Vektor nach Anspruch 13 oder eine Zelle nach Anspruch 14 umfaßt.
16. Arzneimittel nach Anspruch 15, das ferner pharmazeutisch verträgliche Träger, Hilfsmittel oder Adjuvantien umfaßt.
- 35 17. Verwendung eines Arzneimittels nach Anspruch 15 oder 16 für die Behandlung von Tumorerkrankungen.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorerkrankung aus der Gruppe bestehend aus Bronchialkarzinomen und anderen Tumoren des Thorax und des Mediastinums, Mammakarzinomen und andere gynäkologischen Tumoren, kolorektalen Karzinomen, Pankreaskarzinomen und anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, malignen Melanomen und andere Tumoren der Haut, Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, Prostatakarzinomen und andere Urogenitaltumoren, Sarkomen, endokrin-aktiven Tumoren, Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen sowie Hodgkin-Lymphomen und Non-Hodgkin-Lymphomen ausgewählt ist.

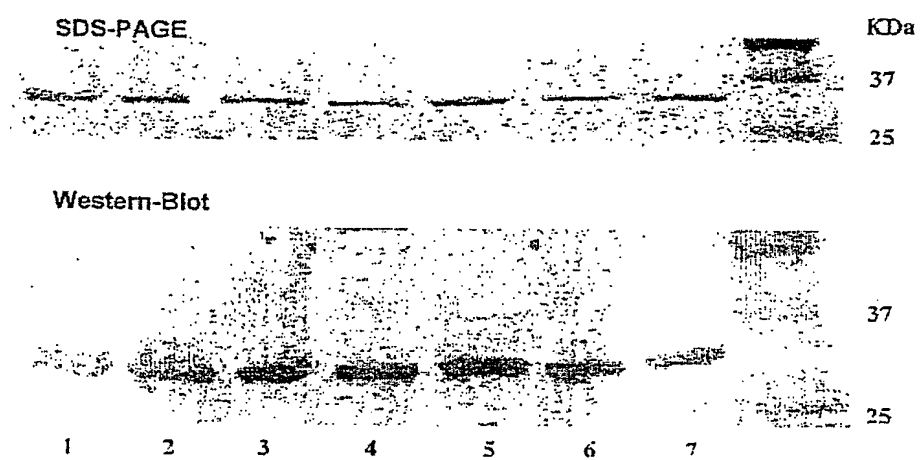
Fig. 1:

1/22



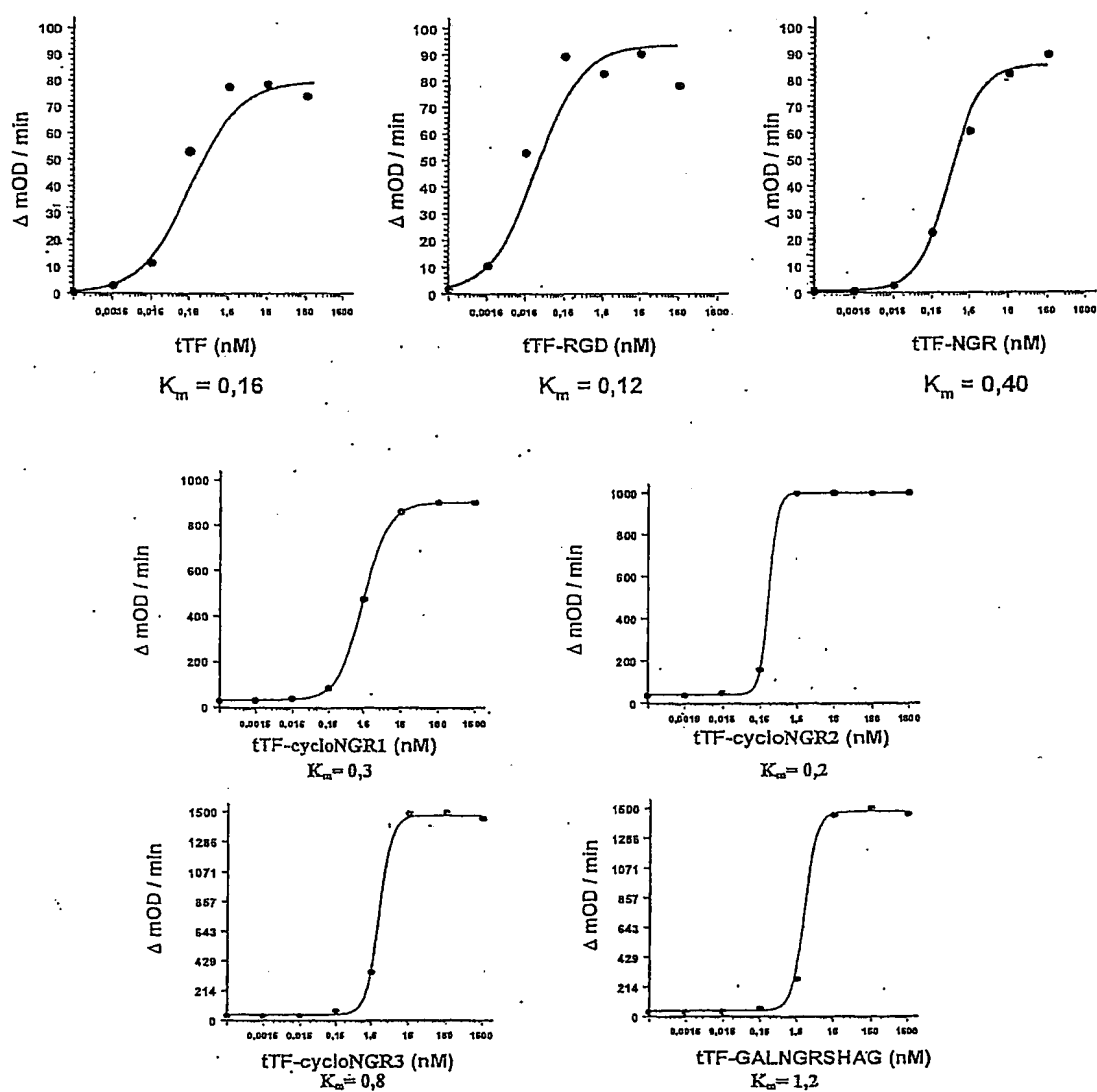
2/22

Fig. 2:



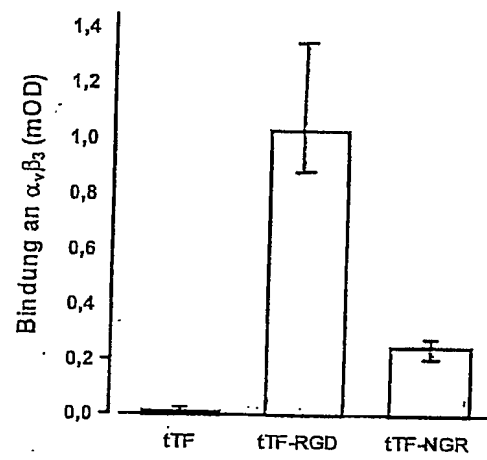
3/22

Fig. 3:



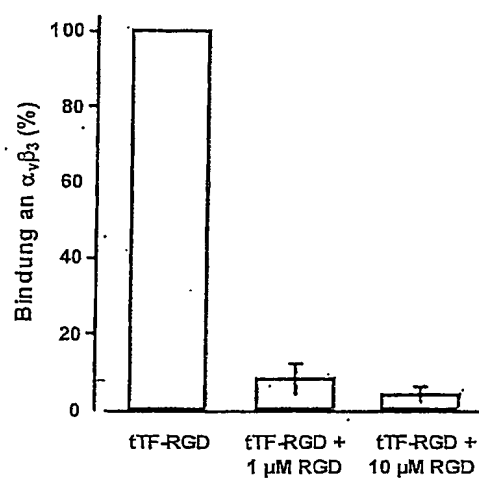
4/22

Fig. 4:



5/22

Fig. 5:



6/22

Fig. 6:

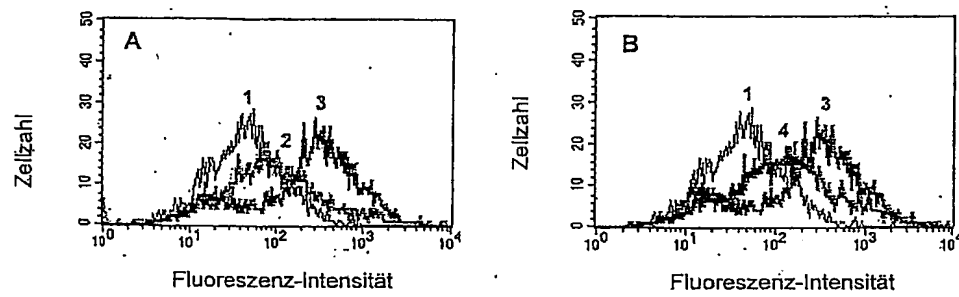


Fig. 7:

7/22

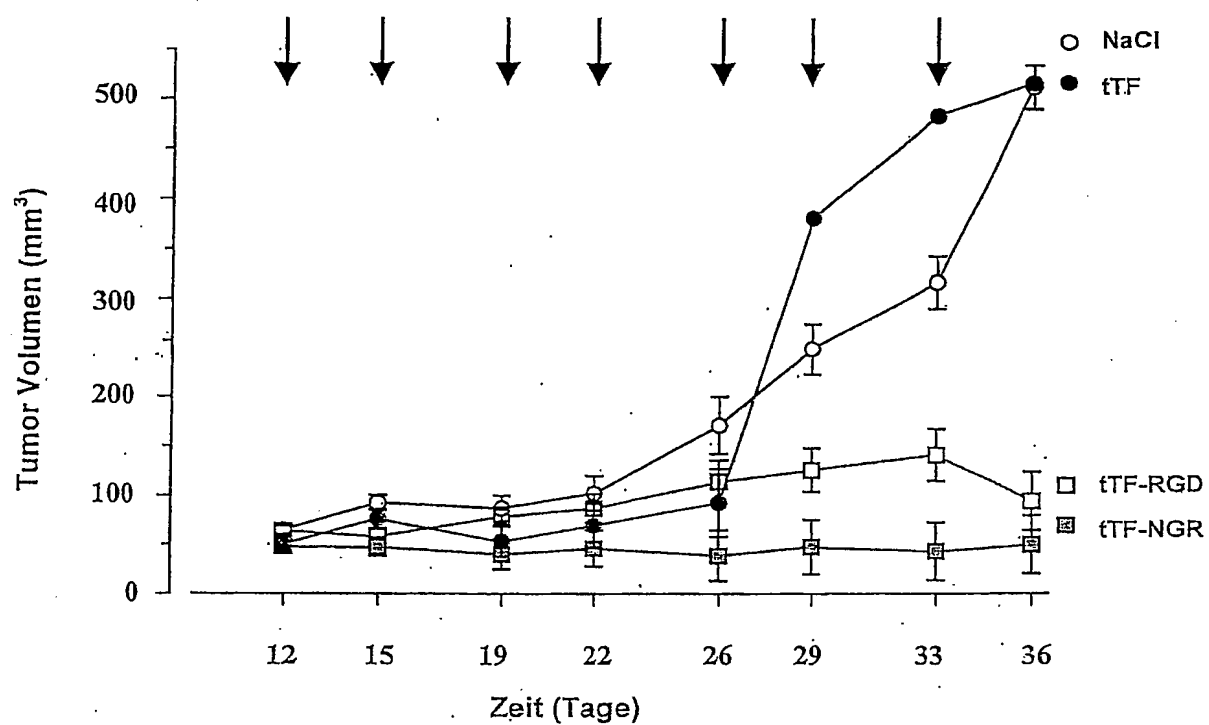


Fig. 8:

8/22

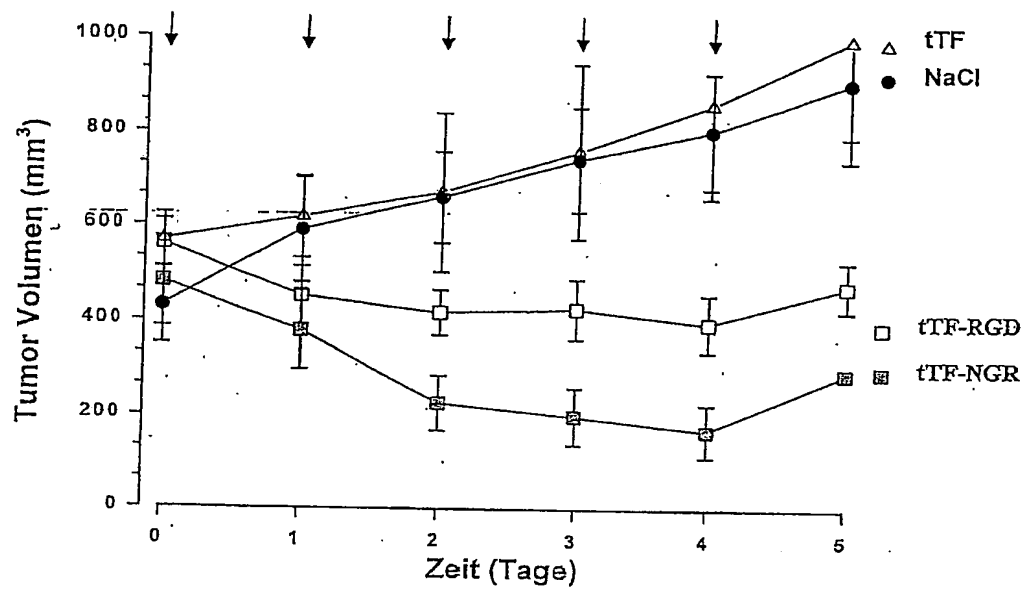


Fig. 9:

9/22

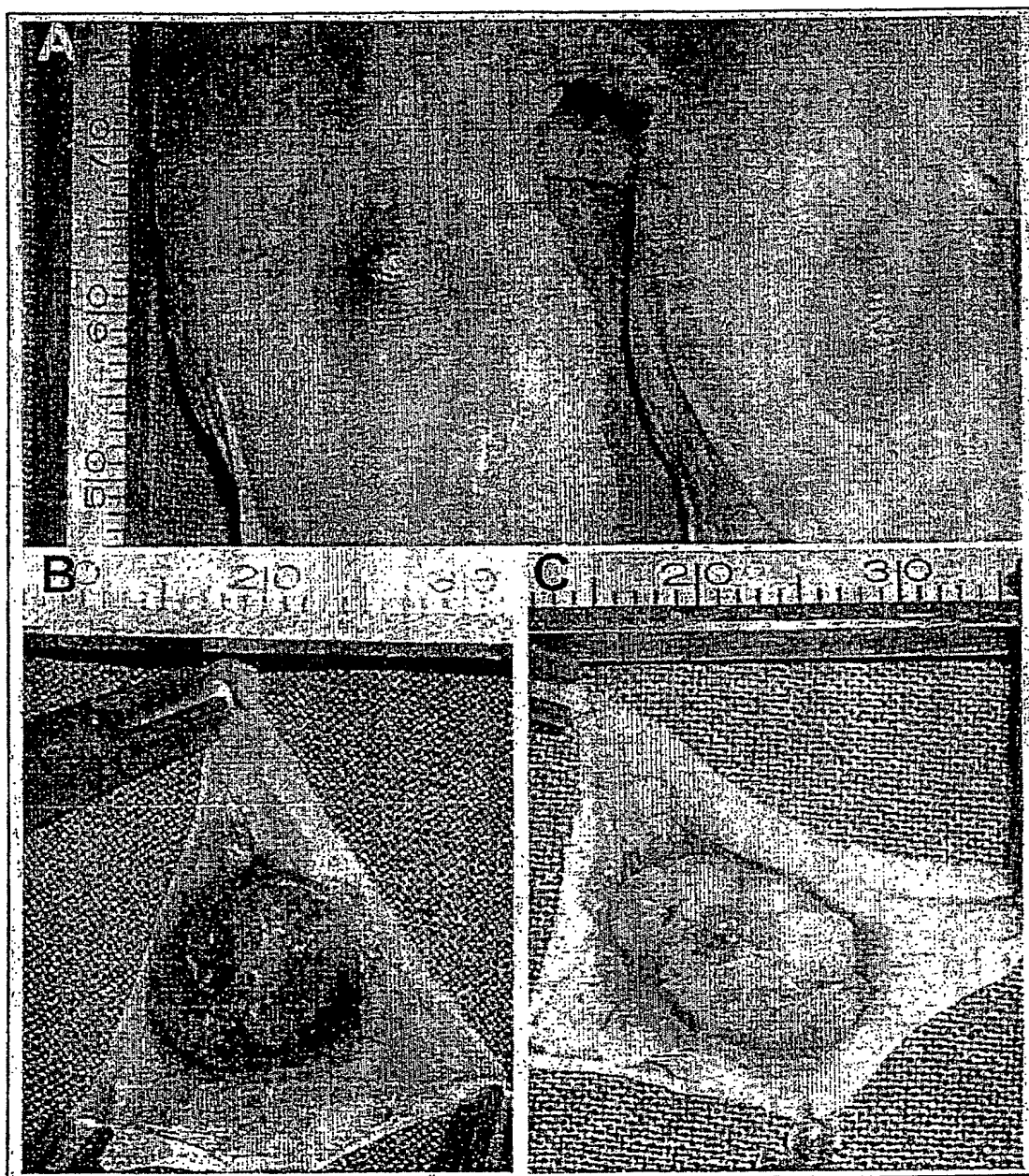


Fig. 10:

10/22

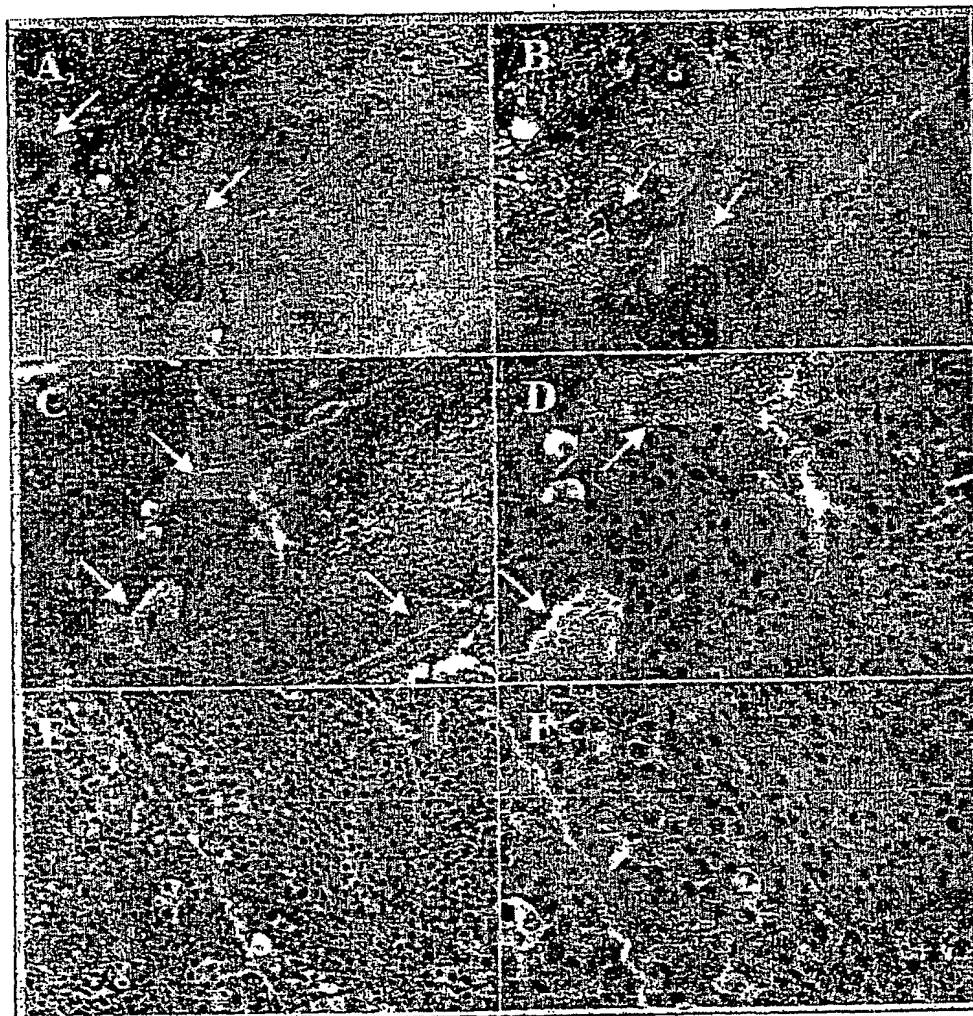
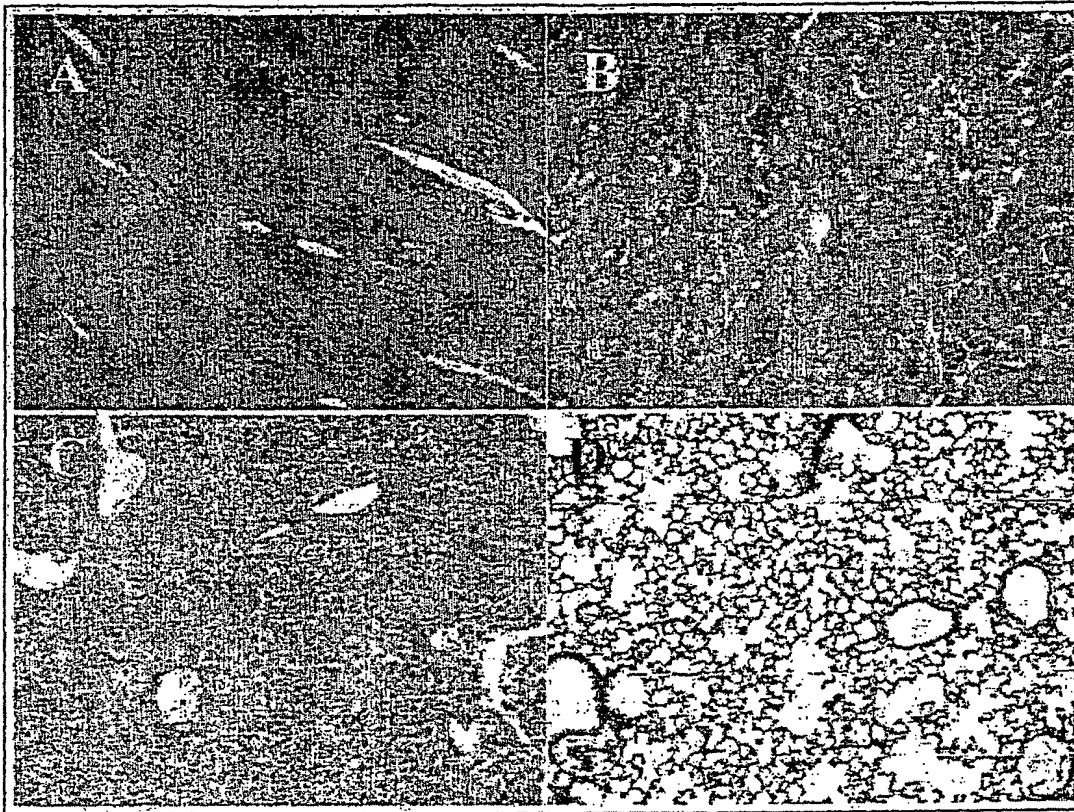


Fig. 11:



12/22

Fig. 12:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFREIFYIIGAVVFVVIILVILAILHLKCRKAGVGQSW
KENSPLNVS

Fig. 13:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFR

13/22

Fig. 14:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTNVRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGRGDSD

Fig. 15:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTNVRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGNGRAHA

Fig. 16

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTNVRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGALNGRSHAG

14/22

Fig. 17:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGCNGRCG

Fig. 18:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGCNGRCVSGCAGRC

Fig. 19:

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSCKFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRGCVLNGRMEC

Fig. 20:

15/22

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAGCAAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTTACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAAGGAACAACACTTTCTTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAAGGGGAATTCAGA

Fig. 21:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAGCAAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTTACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAAGGAACAACACTTTCTTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAAGGGGAATTCAGAG
GAAGAGGTGATTCTCCA

Fig. 22:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAGCAAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTTACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAAGGAACAACACTTTCTTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAAGGGGAATTCAGAG
GTAACCGGAAGAGCACATGCA

Fig. 23:

16/22

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAGCAAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTAAGTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCAGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
GTGCTTTAAATGGAAGATCTCACGCTGGT

Fig. 24:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAGCAAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTAAGTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCAGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
GCTGCAACGGTAGATGTGGT

Fig. 25:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAGCAAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTAAGTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCAGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
TTGTAATGGAAGATGTGTTTCTGGATGTGCAGGACGATGT

17/22

Fig. 26:

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAA
TTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAG
ATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAG
GATGTGAAGCAGACGTA CTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGT
TCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGA
CAGCCAACAATTCAAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACG
GACTTTAGTCAGAAAGGAACAACACTTTTCTAAGCCTCCGGGATGTTTTGGCAAGGACTTAATTTAT
ACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTGTTTCAAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCCCGAACA
GTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAG
GATGCGTCTTAAATGGTAGGATGGAATGC

Fig. 27:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTATCTGAATTCCTCTTCTCCTGGCCCAT-3'

Fig. 28:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTATGGAGAATCACCTCTTCTCCTGAATTCCTCC-3'

Fig. 29:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTATGCATGTGCTCTTCCGTTACCTCTGAATTCCTCC-3'

Fig. 30:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTAAACCACATCTACCGTTGCAGCCTCTGAATTCCTCC-3'

18/22

Fig. 31:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTAAACATCGTCCTGCACATCCAGAAACACATCTTCCATTACAACC
TCTGAATTCCCC-3'

Fig. 32:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTA GCA TTC CAT CCT ACC ATT TAA GAC GCA TCC TCTGAATTCCCC-3

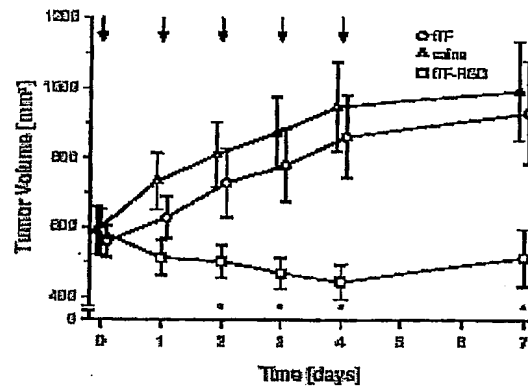
Fig. 33:

A: 5'-CATGCCATGGGATCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAAT-3'
B: 5'-CGGGATCCTATTA ACCAGCGTGAGATCTTCCATTAAAGCACCTCTGAATTCCCC-3'

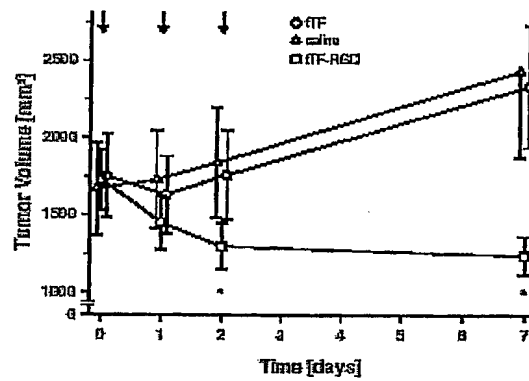
Fig. 34

19/22

a



b



c

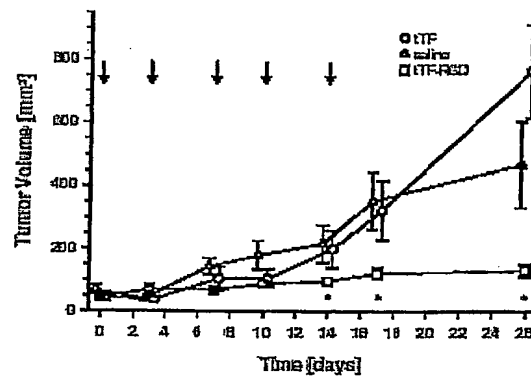


Fig. 35

20/22



Fig. 36

21/22

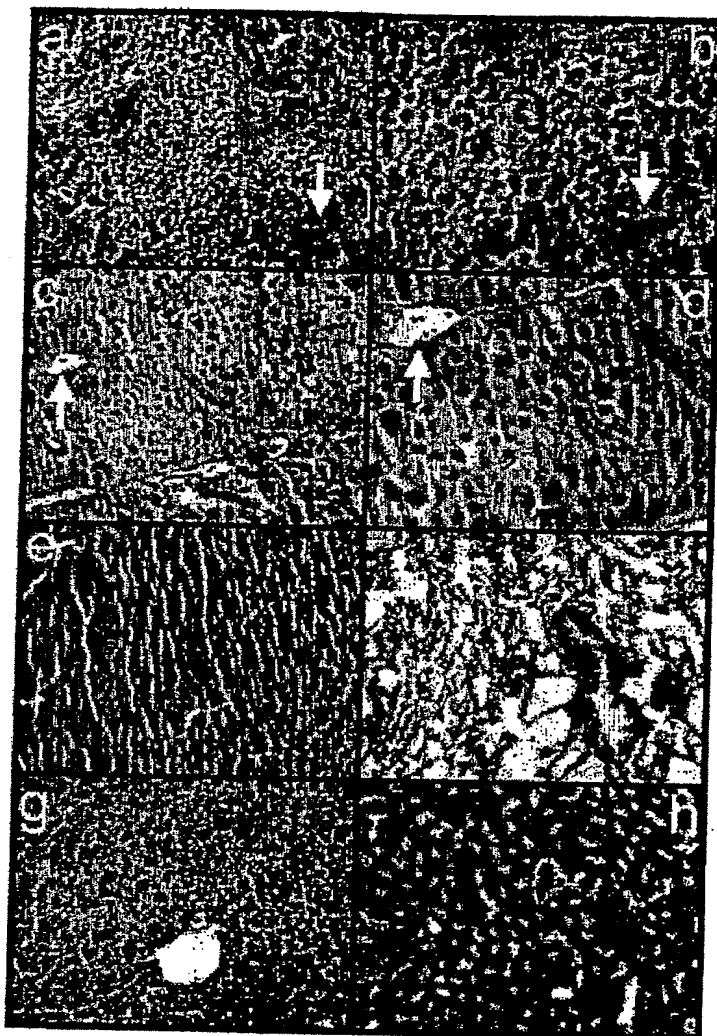
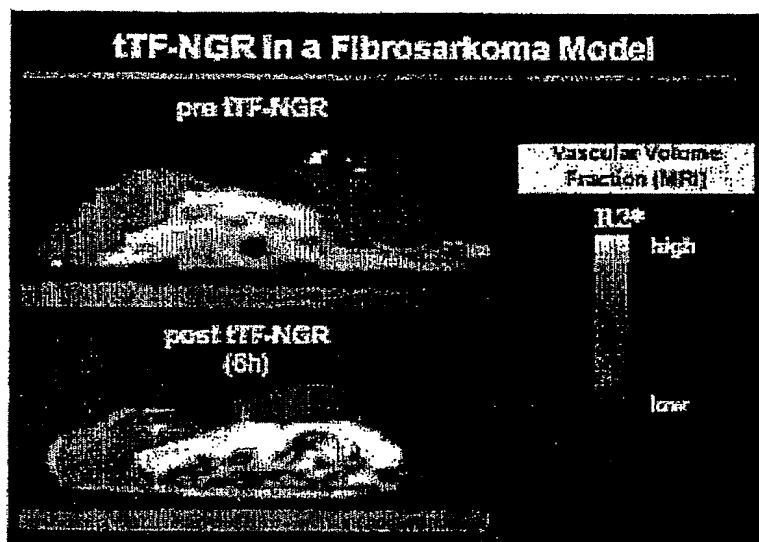


Fig. 37

22/22



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Medizinische Klinik und Poliklinik A des Universitätsklinikums Münster
 <120> Fusionspolypeptide für die antivaskuläre Tumorthherapie
 <130> P 51875
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Aminosäuresequenz von humanem TF

<400> 1
 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 20 25 30
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195 200 205
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
 210 215 220
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
 225 230 235 240
 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
 245 250 255
 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
 260

<210> 2
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Aminosäuresequenz von tTF₁₋₂₁₈

<400> 2
 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 20 25 30
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195

200

205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg
 210 215

<210> 3
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Aminosäuresequenz von tTF-GRGDSP

<400> 3
 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 20 25 30
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Arg Gly Asp Ser Asp
 210 215 220

<210> 4
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<221> Aminosäuresequenz von tTF-GNGRAHA

<400> 4

Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	1	5	10	15
Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	20	25	30	
Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	35	40	45	
Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	50	55	60	
Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	65	70	75	80
Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	85	90	95	
Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	100	105	110	
Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	115	120	125	
Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	130	135	140	
Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	145	150	155	160
Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	165	170	175	
Ile	Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	180	185	190	
Ile	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu	195	200	205	
Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Gly	Asn	Gly	Arg	Ala	His	210	215	220	

Ala
 225

<221> Aminosäuresequenz von tTF-GALNGRSHAG

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
1 5 10 15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
20 25 30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 . 35 40 45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
50 55 60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
85 90 95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
100 105 110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
115 120 125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130 135 140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175

```

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
      180                      185                      190

```

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Ala Leu Asn Gly Arg
210 215 220

Ser His Ala Gly
225

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<221> Aminosäuresequenz von tTF-GCNGRCG

<400> 6

Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	1	5	10	15
Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	20	25	30	
Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	35	40	45	
Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	50	55	60	
Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	65	70	75	80
Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	85	90	95	
Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	100	105	110	
Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	115	120	125	
Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	130	135	140	
Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	145	150	155	160
Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	165	170	175	
Ile	Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	180	185	190	
Ile	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu	195	200	205	
Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Gly	Cys	Asn	Gly	Arg	Cys	210	215	220	
Gly																225			

<210> 7
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Aminosäuresequenz von tTF-GCNGRCVSGCAGRC

<400> 7
 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 20 25 30
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Cys Asn Gly Arg Cys
 210 215 220
 Val Ser Gly Cys Ala Gly Arg Cys
 225 230

```
<220>
<221> Aminosäuresequenz von tTF-GCVLNGRMEC
```

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
1 5 10 15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
20 25 30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
35 40 45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
50 55 60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
85 90 95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 . 100 105 110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
115 120 125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130 135 140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175

```

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
      180                      185                      190

```

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Cys Val Leu Asn Gly
210 215 220

Arg Met Glu Cys
225

<210> 9
<211> 654
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> Nukleotidsequenz von tTF₁₋₂₁₈

<400> 9

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag	60
acaatttttg agtggaacc caaaccgctc aatcaagtct acactgttca aataagcact	120
aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc	180
gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca	240
gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc ccagagttc	300
acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga	360
acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggacttttag tcagaaggaa caacactttc	420
ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct	480
tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat	540
aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgatc cctcccgaac agttaaccgg	600
aagagtacag acagcccggt agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt caga	654

<210> 10
<211> 672
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> Nukleotidsequenz von tTF-GRGDSP

<400> 10

tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag	60
acaatttttg agtggaacc caaaccgctc aatcaagtct acactgttca aataagcact	120
aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc	180
gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca	240
gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc ccagagttc	300
acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga	360
acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggacttttag tcagaaggaa caacactttc	420
ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct	480
tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat	540
aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgatc cctcccgaac agttaaccgg	600

aagagtacag acagcccggt agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggaaga 660
 ggtgattctc ca 672

<210> 11
 <211> 675
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> Nukleotidsequenz von tTF-GNGRAHA

<400> 11
 tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatftttgg agtggaacc caaaccgctc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac ggtcttctc ctaccggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga 360
 acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggactttag tcagaaggaa caacactttc 420
 ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct 480
 tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat 540
 aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgattc cctccgaac agttaaccgg 600
 aagagtacag acagcccggt agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggtaac 660
 ggaagagcac atgca 675

<210> 12
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> Nukleotidsequenz von tTF-GALNGRSHAG

<400> 12
 tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
 acaatftttgg agtggaacc caaaccgctc aatcaagtct aactgttca aataagcact 120
 aagtcaggag attggaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
 gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac ggtcttctc ctaccggca 240
 gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagttc 300
 acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga 360

acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggacttttag tcagaaggaa caacactttc 420
ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct 480
tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat 540
aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgattc cctcccgaac agttaaccgg 600
aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagagggtgc 660
ttaaatggaa gatctcacgc tggg 684

<210> 13
<211> 675
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> Nukleotidsequenz von tTF-GCNGRCG

<400> 13
tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60
acaatttttg agtggaacc caaaccgctc aatcaagtct acactgttca aataagcact 120
aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc 180
gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctctctc ctaccggca 240
gggaatgtgg agagbaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc ccagagttc 300
acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga 360
acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggacttttag tcagaaggaa caacactttc 420
ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct 480
tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat 540
aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgattc cctcccgaac agttaaccgg 600
aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagagggtgc 660
aacggtagat gtgg 675

<210> 14
<211> 696
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> Nukleotidsequenz von tTF-GCNGRCVSGCAGRC

<400> 14
tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag 60

```

acaattttgg agtgggaacc caaaccgctc aatcaagtct acactgttca aataagcact    120
aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc    180
gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctcttctc ctaccggca    240
gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagttc    300
acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga    360
acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggacttttag tcagaaggaa caacactttc    420
ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct    480
tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat    540
aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgatcc cctcccgaac agttaaccgg    600
aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggttgt    660
aatggaagat gtgtttctgg atgtgcagga cgatgt                                696

```

```

<210> 15
<211> 684
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<221> Nukleotidsequenz von tTF-GCVLNGRMEC

```

```

<400> 15
tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag    60
acaattttgg agtgggaacc caaaccgctc aatcaagtct acactgttca aataagcact    120
aagtcaggag attggaaaag caaatgcttt tacacaacag acacagagtg tgacctcacc    180
gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg tacttggcac gggctcttctc ctaccggca    240
gggaatgtgg agagcaecgg ttctgctggg gagcctctgt atgagaactc cccagagttc    300
acaccttacc tggagacaaa cctcggacag ccaacaattc agagttttga acaggtggga    360
acaaaagtga atgtgaccgt agaagatgaa cggacttttag tcagaaggaa caacactttc    420
ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac ttaatttata cactttatta ttggaaatct    480
tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca aacactaatg agtttttgat tgatgtggat    540
aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa gcagtgatcc cctcccgaac agttaaccgg    600
aagagtacag acagcccggg agagtgtatg ggccaggaga aaggggaatt cagaggtatgc    660
gtcttaaatg gtaggatgga atgc                                            684

```

<210> 16
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF₁₋₂₁₈

<400> 16
catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataataat 45

<210> 17
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF₁₋₂₁₈

<400> 17
cgggatccta ttatctgaat tcccctttct cctggcccat 40

<210> 18
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GRGDSP

<400> 18
catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataataat 45

<210> 19
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GRGDSP

<400> 19
cgggatccta ttatggagaa tcacctcttc ctctgaattc ccc 43

<210> 20
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GNGRAHA

<400> 20
catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataataat 45

<210> 21
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GNGRAHA

<400> 21
cgggatccta ttagcatgt gctcttccgt tacctctgaa ttcccc 46

<210> 22
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GCNGRCG

<400> 22
catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataata 45

<210> 23
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GCNGRCG

<400> 23
cgggatccta ttaaccacat ctaccgttgc agcctctgaa ttcccc 46

<210> 24
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GCNGRCVSGCAGRC

<400> 24
catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataata 45

<210> 25
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GCNGRCVSGCAGRC

<400> 25
cgggatccta ttaacatcgt cctgcacatc cagaaacaca tcttcatta caacctctga 60

attcccc

67

<210> 26
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GCVLNGRMEC

<400> 26

catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataataat

45

<210> 27
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GCVLNGRMEC

<400> 27

cgggataccta ttagcattcc atcctaccat ttaagacgca tcctctgaat tcccc

55

<210> 28
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 5' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GALNGRSHAG

<400> 28

catgccatgg gatcaggcac tacaaatact gtggcagcat ataataat

45

<210> 29
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> 3' Oligonukleotidprimer für die Herstellung von tTF-GALNGRSHAG

<400> 29

cgggataccta ttaaccagcg tgagatcttc catttaaagc acctctgaat tcccc

55

<210> 30
<211> 45
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Aminosäuresequenz des Affinitäts-tags

<400> 30

His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	
Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser
			20					25					30		
Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Met	Gly			
		35					40					45			

<210> 31

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Aminosäuresequenz von tTF-GRGDSP mit N-terminalem Affinitäts-tag

<400> 31

His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	
Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser
			20					25					30		
Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Met	Gly	Ser	Gly	Thr
		35					40					45			
Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	Phe
	50					55					60				
Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Thr
65				70					75					80	
Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	Tyr
			85					90						95	
Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Asp	Val
			100					105					110		
Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Val
		115					120						125		
Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	Pro	Glu
	130					135					140				
Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser
145				150					155					160	
Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Glu	Arg
			165					170						175	
Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	Asp	Val	Phe
			180					185						190	

Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser
 195 200 205

Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val
 210 215 220

Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser
 225 230 235 240

Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly
 245 250 255

Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Gly Arg Gly Asp Ser Asp
 260 265

<210> 32

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Aminosäuresequenz von tTF-GNGRAHA mit N-terminalem Affinitäts-tag

<400> 32

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 20 25 30

Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met Gly Ser Gly Thr
 35 40 45

Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe
 50 55 60

Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr
 65 70 75 80

Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr
 85 90 95

Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val
 100 105 110

Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val
 115 120 125

Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu
 130 135 140

Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser
 145 150 155 160

Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg
 165 170 175

Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe
 180 185 190

Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser
	195						200					205			
Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	Ile	Asp	Val
	210					215					220				
Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	Ile	Pro	Ser
225					230					235					240
Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu	Cys	Met	Gly
				245					250					255	
Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Gly	Asn	Gly	Arg	Ala	His	Ala		
			260					265					270		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/745 C07K19/00 A61K38/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>HU PEISHENG ET AL: "Comparison of three different targeted Tissue Factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis." CANCER RESEARCH, vol. 63, no. 16, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 5046-5053, XP002316414 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document</p> <p>----- -/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 2005

Date of mailing of the international search report

23/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009364

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>RIPPMANN J F ET AL: "FUSION OF THE TISSUE FACTOR EXTRACELLULAR DOMAIN TO A TUMOUR STROMASPECIFIC SINGLE-CHAIN FRAGMENT VARIABLE ANTIBODY RESULTS IN AN ANTIGEN-SPECIFIC COAGULATION-PROMOTING MOLECULE" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 349, no. 3, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 805-812, XP001021508 ISSN: 0264-6021 the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>ARAP W ET AL: "CANCER TREATMENT BY TARGETED DRUG DELIVERY TO TUMOR VASCULATURE IN A MOUSE MODEL" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 279, 16 January 1998 (1998-01-16), pages 377-380, XP000857470 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>WO 03/035688 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 1 May 2003 (2003-05-01) cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	

Information on patent family members

PCT/EP2004/009364

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/009364

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/745 C07K19/00 A61K38/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HU PEISHENG ET AL: "Comparison of three different targeted Tissue Factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis." CANCER RESEARCH, Bd. 63, Nr. 16, 15. August 2003 (2003-08-15), Seiten 5046-5053, XP002316414 ISSN: 0008-5472 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Februar 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/02/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/009364

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>RIPPMANN J F ET AL: "FUSION OF THE TISSUE FACTOR EXTRACELLULAR DOMAIN TO A TUMOUR STROMASPECIFIC SINGLE-CHAIN FRAGMENT VARIABLE ANTIBODY RESULTS IN AN ANTIGEN-SPECIFIC COAGULATION-PROMOTING MOLECULE"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, Bd. 349, Nr. 3, 1. August 2000 (2000-08-01), Seiten 805-812, XP001021508 ISSN: 0264-6021 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>ARAP W ET AL: "CANCER TREATMENT BY TARGETED DRUG DELIVERY TO TUMOR VASCULATURE IN A MOUSE MODEL"</p> <p>SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 279, 16. Januar 1998 (1998-01-16), Seiten 377-380, XP000857470 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>WO 03/035688 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 1. Mai 2003 (2003-05-01) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/009364

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03035688 A	01-05-2003	WO 03035688 A2	01-05-2003
		EP 1443954 A2	11-08-2004
		US 2003194400 A1	16-10-2003
<hr/>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.